Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. A. Bohle)

DIE WIRKUNG VON ALDOSTERON AUF DIE Na-K-STIMULIERTE ATPase IN VERSCHIEDENEN NEPHRONABSCHNITTEN DER ADRENALEKTOMIERTEN RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Harald Schmid
aus Esslingen
1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0086

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 51 85 63
Printed in Germany

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. A. Bohle)

DIE WIRKUNG VON ALDOSTERON AUF DIE Na-K-STIMULIERTE ATPase IN VERSCHIEDENEN NEPHRONABSCHNITTEN DER ADRENALEKTOMIERTEN RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Harald Schmid
aus Esslingen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. W. Schlote
1. Berichterstatter: Doz. Dr. U. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bohle
Korreferentin: Doz. Dr. R. Rössler

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODE	4
A) Allgemeine Methodik	4
B) Versuchsanordnung und spezieller Arbeitsgang	11
C) Bezugsquelle der benutzten Substrate und Reagentien	15
ERGEBNISSE	16
DISKUSSION	2o
ZUSAMMENFASSUNG	26
ZAHLENTABELLEN	27
LITERATURVERZEICHNIS	3o
NACHWORT	37

A B K Ü R Z U N G E N

Adrex	Adrenalektomie
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Comix	Analysenmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	gewundenes Mittelstück
DTI	Mittelstück, Markinnenstreifen
EC	Enzym-Code
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
GAPDH	Glyzeraldehydphosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3)
Glu-1-P	Glukose-1-Phosphat
Glu-6-P	Glukose-6-Phosphat
Glu-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (EC 2.6.1.1)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2)
α-Keto-Gl	α-Keto-Glutarat
MKH	Mol umgesetztes Substrat pro kg Trockengewicht pro Stunde
NADP(NADPH$_2$)	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat
NAD(NADH$_2$)	Nikotinamidadenindinukleotid
NaKATPase	durch Na^+ und K^+ stimulierte Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3)
PAS-Färbung	Periodic-Acid-Schiffs-Färbung
PE	Polyäthylen
6-PGDH	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.43)
6-PGlu	6-Phosphoglukonat
PGM	Phosphoglukomutase (EC 2.7.5.1)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P_i	anorganisches Phosphat
PN	Pyridinnukleotid
PTC	gewundenes Hauptstück
Q. H.	Quantitative Histochemie
Rib-5-P	Ribulose-5-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
SDM	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
$\bar{x}$	Mittelwert

E I N L E I T U N G

Gerichtete Transportvorgänge an der Zellmembran spielen für die Aufrechterhaltung der Individualität der Zelle gegenüber einer sich verändernden Umgebung eine entscheidende Rolle. Dies gilt für die Aufnahme und Abgabe von Nährstoffen bzw. Abfallprodukten, insbesondere aber für die Konstanthaltung der unterschiedlichen Ionenzusammensetzung von intrazellulärem und extrazellulärem Milieu. Die Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsgradienten an der Membran ist ein aktiver, mit Arbeit verbundener Prozeß. Die hierfür notwendige Energie wird von der Zelle in Form von ATP bereitgestellt. Werden die energieliefernden Stoffwechselwege durch spezifische Gifte gehemmt, kommt es zum Versagen des Ionentransportes. So führt zum Beispiel die Blockierung der oxydativen Phosphorylierung im Nierengewebe durch Zyanid zur Natriurese (Übersicht bei 35). Derartige energieverbrauchende Transportmechanismen werden unter dem Begriff 'Pumpe' zusammengefaßt.

Unsere Vorstellung über Struktur und Wirkungsweise der Natrium-Pumpe wurde durch die Entdeckung eines ATP-spaltenden Enzymes, einer ATPase, wesentlich erweitert. Dieses Enzym wird wegen seiner Stimulierbarkeit durch Na^+ und K^+ NaKATPase genannt. Die Eigenschaften der NaKATPase decken sich weitgehend mit denen des aktiven transmembranen Na-Transportes (17, 38). Dies konnte auch am Nierengewebe nachgewiesen werden (35). Beide Systeme, die NaKATPase und der transmembrane Na-Transport, sind an die Intaktheit der Zellmembran gebunden. Beide Systeme werden durch Na^+ und K^+ bei einem Konzentrationsverhältnis von 1o:1 aktiviert und durch Glykoside gehemmt. In beiden Fällen ist ATP spezifisches Substrat. Weiterhin sind Pumpe und Enzym gleichermaßen p_H- und temperaturabhängig. Auf Grund dieser kinetischen Übereinstimmungen wird die NaKATPase als Transportenzym angesprochen. Hinzu kommt, daß alle Organe mit hoher Na-Transportrate eine hohe

Aktivität der NaKATPase aufweisen; die höchsten Aktivitätswerte finden sich im Hirn und in der Niere (35).

Bei der Regulation des Na-Transportes im Nierentubulus spielen die Mineralokortikoide der Nebennierenrinde eine herausragende Rolle. Die Aktivierung der Ionenpumpe durch das Aldosteron konnte besonders am Modell der isolierten Krötenblase wiederholt bestätigt werden (8, 37).

Unter Wegfall der Aldosteron-Wirkung nach Entfernung der Nebennieren wurde an der Rattenniere ein erhöhter Gehalt an Na^+ und ein verminderter an K^+ im distalen Tubulus beobachtet (14, 15). Die Natriurese trat bereits 4 Stunden nach Adrenalektomie auf (46). Auch die mit dem Na-Transportsystem eng gekoppelte oder gar identische NaKATPase unterliegt dem Einfluß der Nebennierenrinde. Allerdings wies die Enzymanalyse in der Mikrosomenfraktion des Rattennierenhomogenates erst 24-48 Stunden nach Adrenalektomie eine leichte Reduktion der Aktivität auf (3, 7, 19, 25). Dieses zeitliche Nachhinken wurde von Schmidt und Dubach auf das geringe Volumen der aktivitätsreicheren distalen Tubuli im Nierenhomogenat zurückgeführt (36). Sie bestimmten die NaKATPase an einzelnen durch Mikrodissektion gewonnenen Tubuli und beobachteten bereits 6 Stunden nach Adrenalektomie einen Abfall der Enzymaktivität im distalen und nach 24 Stunden auch im proximalen Tubulus.

Werden adrenalektomierte Ratten mit Aldosteron substituiert, so kommt es 1-2 Stunden nach Hormongabe zur Aufhebung der Na-Transportstörung. Diese Beobachtung wurde bei Mikropunktionsversuchen (16, 44) und flammenphotometrischen Urinelektrolytbestimmungen (12, 46) gemacht. Dabei wurde eine eindeutige Beeinflussung des transmembranen Na-Transportes im distalen Tubulus durch Aldosteron gezeigt (15); offensichtlich wirkt dieses Steroid aber auch in den proximalen Tubulusabschnitten (16). Im Gegensatz zu dieser raschen Beseitigung der Ausfallserscheinungen war in der renalen

Mikrosomenfraktion erst 14 Stunden nach Aldosteronverabreichung die Aktivität der NaKATPase signifikant erhöht (2o). Diese zeitliche Unstimmigkeit zwischen Anstieg des Na-Transportes und Anstieg der Enzymaktivität führte zu der Annahme, daß zwischen NaKATPase und Mineralausscheidung kein direkter Zusammenhang bestehe (3, 2o, 25).

Da jedoch mit Hilfe der verfeinerten Mikrodissektionsmethode der Quantitativen Histochemie schon nach Adrenalektomie eine rasche Reaktion der NaKATPase-Aktivität zu beobachten war (36), kann eine primäre Beeinflussung des Enzyms durch das Aldosteron nicht ausgeschlossen werden. Deshalb soll in dieser Arbeit mit der genannten Methode an isolierten Nephronstrukturen geklärt werden, ob bereits 9o Minuten nach Aldosteronverabreichung bei der adrenalektomierten Ratte eine Stimulierung der NaKATPase auftritt und wo innerhalb des Tubulusapparates dieser Aktivitätsanstieg festzustellen ist.

MATERIAL UND METHODE

A) Allgemeine Methodik

Die in dieser Arbeit beschriebenen Enzymanalysen wurden mit den Methoden der Quantitativen Histochemie (Q. H.), der sogenannten Lowry-Technik (28), durchgeführt. Die Enzymbestimmung erfolgte dabei an aus lyophilisierten Nierenschnitten isolierten anatomischen Strukturen, die nach der Dissektion gewogen und dann einer ultramikrobiochemischen Analyse zugeführt wurden.

Im folgenden ist der Arbeitsgang der Lowry-Technik beschrieben. Er besteht aus 6 aufeinanderfolgenden Grundschritten (31): Gefrierstop, Herstellung von Gefrierschnitten im Kryostat, Gefriertrocknung, Dissektion, Wiegen, biochemische Analyse (Abb. 1, a-f).

Das G e f r i e r e n des Gewebes (Abb. 1, a) erfolgt möglichst rasch nach der Präparation in flüssigem Stickstoff.

Anschließend werden native G e f r i e r s c h n i t t e in einem Kryostat mit regulierbarer Kühltemperatur bis -3o°C hergestellt (Abb. 1, b). Jeweils alternierend werden die Schnitte lyophilisiert oder gefärbt. Mit Hilfe der gefärbten Schnitte können die anatomischen Strukturen im benachbarten lyophilisierten Schnitt identifiziert werden. Eine gute Darstellung der Interstitien am Nierenschnitt gelingt mit der wässrigen PAS-Färbung. Durch sie wird die Abgrenzung der Nephronsegmente und die vergleichende Orientierung am gefärbten und lyophilisierten Schnitt erleichtert. Die wichtigsten Merkmale der gefärbten Strukturen sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tab. I: Unterscheidung der Nephronsegmente mit der wässrigen PAS-Färbung

	Prox. Tubulus	Dist. Tubulus	Sammelrohr
Cytoplasma	blasses Braunrot	kräftiges Violett	zinnoberrot
Bürstensaum	zinnoberrot	ø	ø
Kerne	eher basal	eher apikal	ungeordnet

Die Färbung wird folgendermaßen durchgeführt:

a) 5' Perjodsäure o,5%
b) 3x wässern mit Aqua bidest.
c) 2o' Schiff'sches Reagens (oder länger, bis Schnitte satt rosa)
d) 1o' bei ca. 38°C wässern
e) kurz wässern mit kaltem Wasser
f) 1' Kernfärbung mit Hämalaun
g) 15' bei ca. 38°C wässern
h) Aufsteigende Alkoholreihe:
   - 5' in 2o%
   - 5' in 4o%
   - 5' in 7o%
   - 5' in 96%
   - 5' in frischem absolutem Alkohol
i) 5' Xylol
k) Einschluß in Eukitt

Hämalaun wird vor jeder Färbung gefiltert. Perjodsäure, Aqua bidest. und absoluter Alkohol werden frisch angesetzt.

Die L y o p h i l i s i e r u n g (Abb. 1, c) erfolgt in einem Vakuum von $5 \cdot 10^{-3}$ Torr. Die Gewebsschnitte befinden sich dabei in speziellen Schnittkammern (28) innerhalb luftdicht verschließbarer Lyophilisierröhren im

Kryostat (Abb. 2). Zwischen Pumpe und Gewebe sind 2 Kühlfallen geschaltet. Diese sind in mit Trockeneis und Aceton

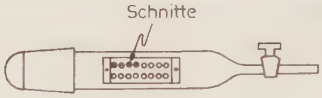

Abb. 2: Lyophilisierröhre mit Schnittkammer

gefüllte Dewar-Gefäße eingetaucht und bewirken durch den Temperaturabfall auf -7o°C eine zusätzliche Vergrößerung des Wasserdampfdruckgefälles. Nach Beendigung der Lyophilisierung wird die Röhre mit dem Gewebe in einer Tiefkühltruhe bei -4o°C gelagert.

Vor der D i s s e k t i o n (Abb. 1,d) wird die Lyophilisierröhre an das Vakuumsystem angeschlossen und auf Zimmertemperatur gebracht. In einer Klimakammer wird die Röhre geöffnet und das Gewebe entnommen. In diesem Raum mit konstanter Temperatur (18°C) und relativer Luftfeuchtigkeit (4o%) finden auch Gewichtsbestimmung und ultramikrobiochemische Analyse statt. Die Dissektion erfolgt freihand unter dem Stereomikroskop bei Betrachtung im Durchlicht. Dabei werden die morphologisch differenzierbaren Elemente im lyophilisierten Schnitt durch abwechselndes Mikroskopieren des benachbarten PAS-Schnittes in einem daneben stehenden Lichtmikroskop identifiziert und herauspräpariert. Als Präparierbesteck dienen kleine, auf Tuberkulinspritzen montierte Kanülen (6). Weiterhin kommen kleine Messerchen aus Rasierklingensplittern zur Anwendung, die über ein kurzes Stück Polyäthylenschlauch mit einem Handgriff verbunden sind. Die Biegsamkeit des Schlauches mildert den Händetremor und

verhindert die Beschädigung von Instrument und Arbeitsplatte durch zu starken Druck.

Als Transportinstrument für die dissezierten Stückchen dienen feine Augenbrauenhaare, die in zugespitzte Glasröhren eingeklebt werden. Die Haftung des Gewebes an der Haarspitze erfolgt durch elektrostatische Kräfte. Eine zu starke elektrostatische Aufladung wird mit Hilfe einer α-Strahlen-Quelle vermieden.

Die dissezierten Gewebsstückchen werden in einer Petri-Schale auf einem speziellen Objektträger (Abb. 3) zur Waage transportiert.

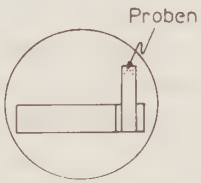

Abb. 3: Objektträger in Petri-Schale. Die Proben liegen auf einem Glasplättchen, das an einen Holzgriff geklebt ist.

W i e g e n (Abb. 1, e). Dissezierte Tubuli haben einen Durchmesser von etwa 5o /um. Ihr Gewicht liegt im Bereich von $1o^{-9}$g. Da für diesen Bereich keine Waagen kommerziell erhältlich sind, werden selbsthergestellte sogenannte Quarzfadenwaagen verwendet. Ihre Empfindlichkeit (S) kann beliebig durch Veränderung von Länge (l) und Durchmesser (d) des Fadens nach der Formel $S = l^3/d^4$ (31) gesteigert werden. In Abbildung 4 ist eine Modifizierung aus den verschiedenen Typen ausgewählt: auf dem Stempel einer Glasspritze ist ein Kupferdraht und an dessen freiem Ende ein Quarzfaden jeweils mit Metallklebstoff befestigt. Beim Wiegen wird das auf dem Objektträger liegende Wägegut (Abb. 3) mit Hilfe eines Mikromanipulators unter die Fadenspitze gefahren und unter stereomikroskopischer Sicht mit dem Transporthaar an

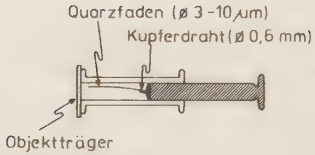

Abb. 4: Quarzfadenwaage nach Lowry (29)

die Fadenspitze gebracht, wo es durch elektrostatische Kräfte haften bleibt. Die Deflexion des Fadens wird an einem Maßstab im Okular abgelesen. Während des Ablesens und nach Beendigung des Wägevorganges wird der Wägeraum mit einem Glasobjektträger verschlossen, der durch Gummizügel auf die Zylinderöffnung gepreßt wird.

Bei der Eichung besteht das Wägegut aus Chininhydrobromidkristallen, deren Größe so gewählt wird, daß sich ihre Gewichte über den gesamten Skalenbereich erstrecken. Nach dem Wiegen werden sie in 1 ml o,1 N H_2SO_4 aufgelöst und gegen eine Chininhydrobromidstandardlösung fluorimetrisch gemessen. Abbildung 5 zeigt die Eichgerade unserer Quarzfadenwaage.

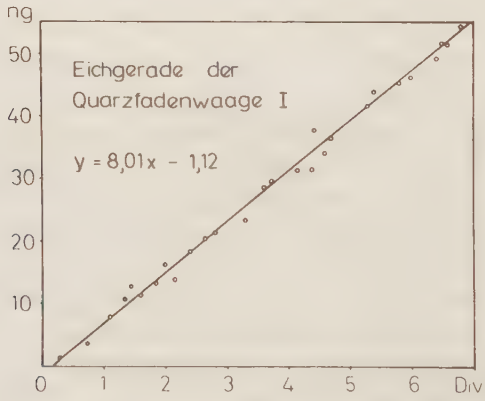

Abb. 5: Eichgerade einer Quarzfadenwaage (5-ml-Glasspritze, Fadenlänge 16 mm, Durchmesser 3 µm). Linearität bis 55 ng.

Um Enzymaktivitäten wie die der NaKATPase in solch kleinen Gewebsmengen wie in einzelnen Tubuli nachzuweisen, muß die b i o c h e m i s c h e A n a l y s e (Abb. 1, f) eine hohe Empfindlichkeit besitzen. Dies wird durch 2 methodische Tricks erreicht:

1) durch drastische Reduktion der Lösungsvolumina auf wenige Nanoliter in den ersten Reaktionsschritten. Solch kleine Volumina werden unter stereomikroskopischer Sicht in Bohrlöcher einer Teflonplatte pipettiert. Um ein Verdunsten zu verhindern, werden die Tröpfchen sofort mit Paraffinöl überschichtet (sog. Öltröpfchen-Technik). Die Pipetten für Volumina im Nanoliter-Bereich müssen selbst hergestellt werden: Ein Glasrohr wird über der Flamme ausgezogen. Der dünnste Abschnitt der Kapillare wird entnommen und in einer zugespitzten Röhre mit Wachs befestigt (Abb. 6). Die Eichung erfolgt mit Chininhydrobromid.

Abb. 6: Selbstangefertigte Pipette für Meßvolumina im Nanoliter-Bereich

2) durch enzymatische Verstärkerreaktionen mit Hilfe sogenannter zyklisierender Systeme. Dabei wird eine konstante Substratmenge in einer ersten Enzymreaktion mit einem Reaktionspartner verändert und anschließend in einer zweiten Reaktion mit einem anderen Partner in die ursprüngliche Form zurückgeführt. Bei solch einem Zyklus entsteht pro Substratmolekül aus dem

jeweiligen Reaktionspartner ein neues Produktmolekül, das anschließend in eine Indikatorreaktion eingeschleust werden kann. Die Endmenge des Produktes beträgt dann je nach Anzahl der durchlaufenen Zyklen pro Zeiteinheit (sog. Cycling-Rate) ein bestimmtes Vielfaches der eingegangenen Substratmenge.

Am gebräuchlichsten ist das Pyridinnukleotid-Cycling. Dabei werden NADP/$NADPH_2$ bzw. NAD/$NADH_2$ bis zu 8ooo mal pro Stunde abwechselnd oxydiert und reduziert (3o). Dadurch können PN-Konzentrationen von $1o^{-15}$moles/µl nachgewiesen werden. Dieser Prozeß kann wiederholt werden (Recycling). Theoretisch wird damit 1 Enzymmolekül nachweisbar (siehe auch Abb. 7).

Außer der Eignung zum Cycling besitzen die Pyridinnukleotide noch weitere Eigenschaften, durch die sie sich als Indikatorsubstanzen für die Umsatzrate enzymatischer Reaktionen auszeichnen:

- die reduzierte Form besitzt Eigenfluoreszenz (Anregungswellenlänge 365 nm, Abstrahlungswellenlänge 48o nm). Mit der Fluoreszenzmessung können $1o^{-12}$moles/µl Ansatz erfaßt werden.
- die reduzierte Form zeigt eine breite Absorptionsbande bei 34o nm, so daß höhere Konzentrationen (bis $1o^{-9}$moles/µl) auch photometrisch gemessen werden können.
- die reduzierte Form wird durch Säure, die oxydierte durch Lauge zerstört ohne Beeinflussung der anderen Form. Sind an mehreren hintereinander ablaufenden Reaktionen PN beteiligt, so kann d e r oxydierte oder reduzierte Anteil, der nicht weiterreagieren darf, leicht unwirksam gemacht werden.
- Im Intermediärstoffwechsel sind die PN als Cosubstrate bei Redox-Reaktionen weit verbreitet.

B) Versuchsanordnung und spezieller Arbeitsgang

Die Versuche wurden an 12 ca. 2oo g schweren männlichen WU-Wistar-Ratten durchgeführt, die aus der Zucht von S. Ivanovas (Kisslegg) stammten. Die Ratten wurden in leichter Äthernarkose nach bilateralem Flankenschnitt beidseitig adrenalektomiert. Nach der Operation erhielten sie 1%ige NaCl-Lösung und Altromin-Standarddiät ad libitum. Eine Woche nach der Operation wurde die Vollständigkeit der Adrenalektomie mit einem Wasserbelastungstest untersucht (39). Dabei erhielten die nüchternen Ratten 5 ml Leitungswasser/1oo g Körpergewicht mit der Schlundsonde verabreicht. Durch viertelstündliches Wiegen wurde die mittlere Halbwertszeit (T/2) bestimmt, bei der 5o% der zugeführten Wassermenge ausgeschieden waren. T/2 war bei den adrenalektomierten Ratten verlängert und betrug 216 ± 45 Minuten (beim Normaltier 51 ± 2 Minuten (39)).

1o Tage nach der Operation wurden die Tiere in 2 Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt 9o Minuten vor der Tötung eine einmalige intraperitoneale Injektion von Aldosteron (6o µg/kg Ratte). Die zweite Gruppe diente als Kontrolle. Die Tiere wurden dekapitiert, die Nieren nach Abdominalschnitt entfernt und dekapsuliert. Mit der Rasierklinge wurden etwa 2 mm dicke Keile herausgeschnitten, mit Tragakanth auf Gefrierblöcken befestigt und damit in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach diesem Gefrierstop wurden die Blöcke für 2 Stunden in einem verschlossenen Gefäß zum Temperaturausgleich in den Kryostat gelegt. Anschließend wurden 16 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Von jeder Schnittebene wurde der erste Schnitt in der Schnittkammer in die Lyophilisierröhre gebracht und im Kryostaten gefriergetrocknet. Die Lyophilisierung wurde über Nacht durchgeführt und dauerte etwa 16 Stunden. Danach wurden die evakuierten Röhren in der Tiefkühltruhe bei -4o°C gelagert. Der benachbarte zweite Schnitt wurde der PAS-Färbung unterzogen.

Nach Auftauen des Gewebes unter Vakuum bei Zimmertemperatur wurde die Lyophilisierröhre in der Klimakammer geöffnet und ein Schnitt aus der Schnittkammer entnommen. Danach wurde

die Röhre 5 Minuten lang leer gesaugt und in die Tiefkühltruhe zurückgelegt. Es folgten Dissektion und Wiegen. Dabei lagen die Gewichte für PTC bei 15-2o ng, für DTI bei 1o-12 ng und für DTC bei 5 ng.

An das Wiegen schloß sich die ultramikrobiochemische Analyse der NaKATPase-Aktivität an. Das Gewebe wurde mit dem Transporthaar in die Bohrlöcher einer Teflonplatte gebracht

Tab. II: Zusammensetzung der Analysenmedien

	Puffer	Substrat	Hilfsenzyme	Zusätze
Comix I	Tris o,1 M, p_H7,4			NaCl 55 mM $MgCl_2$ 2 mM KCl[1)] 5 mM EDTA o,1 mM BSA o,o5 % Ouabain[1)] 2 mM
Comix II	Imidazol o,o5 M, p_H6,9	Glykogen o,o8 % NADP o,3 mM	Phosphorylase a 35 /ug/ml PGM 3 /ug/ml Glu-6-PDH 1 /ug/ml	$MgCl_2$ o,5 mM EDTA 1 mM BSA o,o5 % 5'AMP 1o mM
Comix III	Tris o,1 M, p_H8,o	α-Ketoglutarat 5 mM Ammoniumazetat 25 mM Glu-6-P 1 mM	GLDH 15o /ug/ml Glu-6-PDH 1 /ug/ml	5'ADP o,3 mM BSA o,o2 %
Comix IV	Tris o,o2 M, p_H8,o	NADP o,1 mM	6-PGDH 1oo /ug/ml	$MgCl_2$ 3,25 mM EDTA o,1 mM Ammoniumazetat 64 mM

1) Für die Bestimmung der Total-ATPase enthielt Comix I KCl ohne Ouabain, für die Bestimmung der Mg-ATPase Ouabain ohne KCl

und mit 393 nl Comix I (Zusammensetzung s. Tab. II) bedeckt. Anschließend wurde jedes Tröpfchen mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Durch das Öl hindurch wurden 226 nl ATP 6,25 mM hinzupipettiert. Danach ließ man die Reaktion während 1o minütiger Inkubation bei 37°C ablaufen und stoppte sie durch 4 minütige Inkubation bei 1oo°C im Brutschrank.

In die Bohrlöcher einer zweiten Teflonplatte wurden 1187 nl Comix II (Zusammensetzung s. Tab. II) gegeben und mit 2 Tropfen Paraffinöl überdeckt. Aus den Inkubationströpfchen der ersten Platte wurden jeweils 228 nl entnommen und durch das Öl hindurch in den Comix II pipettiert. Die nun folgende Inkubation dauerte 2o Minuten bei 37°C. Danach wurde aus den Tröpfchen der zweiten Platte 4o6 nl Inkubat in 25o µl o,5 mM Cystein in o,o4 N NaOH in säuregewaschenen PE-Röhrchen gegeben und 1o Minuten bei 6o°C inkubiert. Es folgte 2 minütiges Zentrifugieren bei 15 ooo U/min.

Je 6 µl Inkubat wurden zu 25 µl Comix III (Zusammensetzung s. Tab. II) gegeben, daraufhin 6o Minuten bei 37°C inkubiert und sofort danach 2 Minuten bei 1oo°C, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde 2 Minuten bei 15 ooo U/min zentrifugiert. Darauf wurden 2oo µl Comix IV (Zusammensetzung s. Tab. II) hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 3o Minuten bei 37°C wurde die Fluoreszenz bei einer Primärstrahlung von 365 nm und einer Sekundärstrahlung von 48o nm gegen eine mitgeführte Phosphatstandardverdünnungsreihe im Bereich von $1o^{-12}$ moles/µl gemessen. Die abgelesenen Werte wurden zur Errechnung der Enzymaktivität in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Enzymaktivität (MkH)} = \frac{\text{Standardkonz.(Mol/l)} \cdot \Delta\text{Probenfluoresz.} \cdot \text{Pipettenvolumen(l)}}{\Delta\text{Standardfluoresz.} \cdot \text{Probengewicht(kg)} \cdot \text{Inkub.-zeit (Std.)}}$$

Pipettenvolumen: $226 \cdot 1o^{-9}$ l
Inkubationszeit: 1o Minuten
Δ = Differenz aus Testwert minus Leerwert

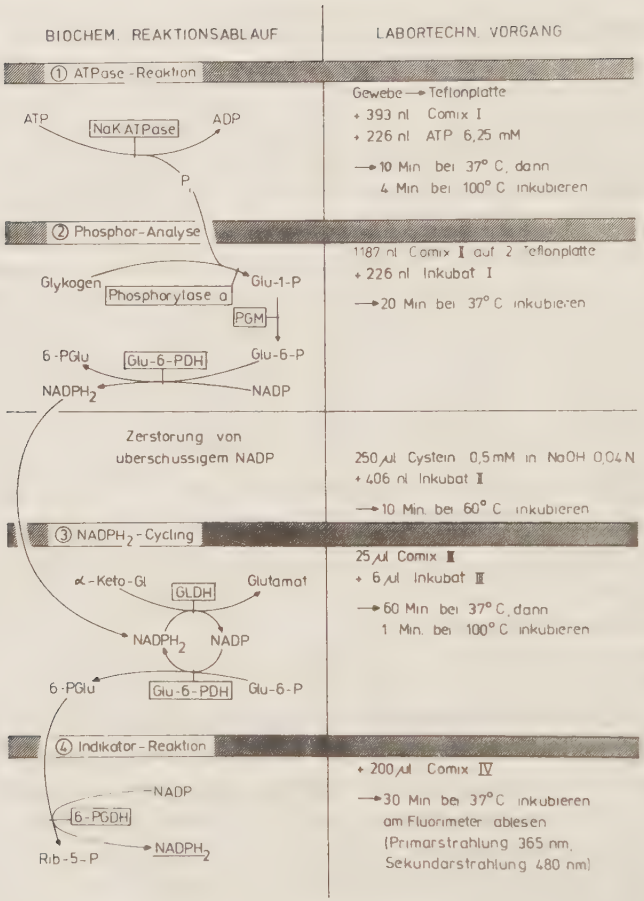

Abb. 7: Gegenüberstellung von biochemischen Vorgängen bei der Bestimmung der NaKATPase-Aktivität (linke Hälfte, modifiziert nach Karlson (21)) und labortechnischem Vorgehen (rechte Hälfte).- Im einzelnen laufen folgende Reaktionen ab: (1) ATPase-Reaktion: ATP wird durch die NaKATPase hydrolytisch in ADP und anorganisches Phosphat (P_i) gespalten. Die entstehende Menge P_i ist ein direktes Maß für die Enzymaktivität. (2) Phosphoranalyse: Das in Reaktion 1 entstandene P_i wird hier enzymatisch bestimmt. Für jedes Phosphatmolekül entsteht 1 Molekül

(Fortsetzung der Legende zu Abb. 7)

$NADPH_2$. Die Konzentration von $NADPH_2$ ist jedoch zu gering, um direkt fluorimetrisch nachgewiesen zu werden. Deshalb wird eine Verstärkerreaktion, das $NADPH_2$-Cycling, angeschlossen. Vorher muß jedoch überschüssiges $NADP$ zerstört werden (mit o,o4 N NaOH). (3) $NADPH_2$-Cycling: Durch abwechselnde Oxydation und Reduktion des eingeschleusten $NADPH_2$ (8ooo mal pro Stunde) entstehen in 1 Stunde für jedes Molekül $NADPH_2$ 8ooo Moleküle 6-P-Glukonat. (4) Indikator-Reaktion: Für jedes aus dem Cycling hervorgegangene Molekül 6-P-Glukonat entsteht 1 Molekül $NADPH_2$ in einer nunmehr so hohen Konzentration, daß es direkt fluorimetrisch gemessen werden kann. Endbilanzmäßig entstehen also durch die Verstärkerwirkung des Cycling für jedes gespaltene ATP-Molekül 8ooo Moleküle $NADPH_2$ (Cyclingdauer 1 Stunde).- Die Schritte 1+2 wurden labortechnisch auf der Teflonplatte, die Schritte 3+4 im PE-Röhrchen durchgeführt.

Die Aktivität der NaKATPase wurde errechnet aus Total-ATPase (ATPase-Reaktion in Gegenwart von K^+ ohne Ouabain) minus Mg-ATPase (ATPase-Reaktion in Abwesenheit von K^+ mit Ouabain).

In Abb. 8 sind dem labortechnischen Vorgehen die sich dabei abspielenden biochemischen Reaktionen gegenübergestellt.

Die Signifikanzprüfung der Differenz zweier Mittelwerte erfolgte mit dem Student-t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < o,o5$ wurde der Unterschied als signifikant angesehen.

C) Bezugsquelle der benutzten Substrate und Reagentien

Aldosteron: Präparat Aldocorten der CIBA AG.
Ouabain: Strophanthinum G der SANDOZ AG.
Phosphorylase a, Glykogen und Rinderserumalbumin:
SIGMA CHEMICAL COMPANY
Alle anderen Enzyme und Substrate: BOEHRINGER Mannheim GMBH

E R G E B N I S S E

Bei der Durchführung der Experimente wurde die Adrenalektomie von den Versuchstieren gut überstanden. Durch die NaCl-Substitution im Trinkwasser konnten sie mühelos wochenlang am Leben erhalten werden. Postoperativ kam es erst zu einem leichten Abfall des Körpergewichtes. Danach stieg das Gewicht langsamer als bei Normaltieren an. Außerdem verhielten sich die operierten Tiere inaktiver als gesunde Vergleichstiere.

Die an den beiden untersuchten Tiergruppen(Adrenalektomie und Adrenalektomie + Aldosteron) gewonnenen Enzymaktivitätswerte sind in Tabelle III dargestellt. Zur besseren Orientierung sind Aktivitätswerte von Normaltieren desselben Rattenstamms in die Tabelle eingefügt. Diese Werte wurden von Schmidt und Dubach ebenfalls mit Hilfe der Mikrodissektionsmethode gewonnen (35)[1].

Die Aktivität der NaKATPase war bei den adrenalektomierten Tieren ohne Aldosteron-Substitution 1o Tage nach der Operation im proximalen Konvolut (PTC), im distalen Konvolut (DTC) und im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (DTI) um mehr als 85% des angeführten Normalwertes vermindert. Durch eine einmalige intraperitoneale Aldosteroninjektion kam es bei der anderen Gruppe von adrenalektomierten Ratten 9o Minuten später zu einem Anstieg der Enzymaktivität in allen 3 Strukturen. Im PTC und DTI stiegen die Werte auf 4o-5o%, im DTC auf ca. 1oo% des Normalwertes. In allen Fällen war die Erhöhung der Total-ATPase nach Aldosteron signifikant gegenüber der nicht substituierten Tiergruppe. Für PTC war $p < o,o5$, für DTI $p < o,oo1$ und für DTC $p < o,oo1$.

Dagegen zeigte die Mg-ATPase in allen untersuchten Nephronabschnitten nach Adrenalektomie keine Erniedrigung, nach zusätzlicher Aldosteronverabreichung keine Erhöhung der Aktivitä

---

[1]: Die Phosphatbestimmung war in diesem Fall mit der Phosphormolybdänblau-Methode durchgeführt worden. Die enzymatische Phosphatbestimmung mit angeschlossenem $NADPH_2$-Cycling zeigte demgegenüber keine unterschiedlichen Ergebnisse (Schmidt, mündliche Mitteilung).

Tab. III: Aktivitätswerte der Total-, Mg- und NaKATPase beim Normaltier, bei der adrenalektomierten Ratte und bei der adrenalektomierten, Aldosteron-substituierten Ratte. Die Aktivitäten sind in Mol umgesetztes anorganisches Phosphat/kg Trockengewicht/Stunde (MKH) angegeben. Vgl. Zahlentabellen S. 27

		Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Normaltier[1]	PTC	7,08 ± 0,25[2] n[3] = 5	5,52 ± 0,28 n = 5	1,56 ± 0,10
	DTI	17,61 ± 0,54 n = 4	5,50 ± 0,55 n = 4	12,10 ± 0,73
	DTC	14,77 ± 2,11 n = 5	6,89 ± 1,39 n = 5	7,88 ± 2,13
Adrenalektomie	PTC	4,90 ± 1,03 n = 11	5,06 ± 1,11 n = 11	-0,16 ± 0,59
	DTI	7,07 ± 1,61 n = 12	5,49 ± 0,77 n = 12	1,58 ± 1,42
	DTC	9,12 ± 1,85 n = 13	8,27 ± 1,11 n = 13	0,85 ± 1,16
Adrenalektomie + Aldosteron	PTC	5,73 ± 0,88 n = 12	5,03 ± 0,63 n = 12	0,69 ± 0,64
	DTI	12,29 ± 3,81 n = 13	6,22 ± 0,98 n = 13	6,08 ± 3,80
	DTC	14,37 ± 3,42 n = 12	6,39 ± 1,63 n = 12	7,98 ± 3,28

1): Die Normalwerte entstammen den Arbeiten von Schmidt und Dubach (35). Sie wurden an mikrodissezierten lyophilisierten Nierentubuli desselben Rattenstammes gewonnen.

2): Standardabweichung

3): n = Anzahl der Einzelanalysen (s. Zahlentabellen S. 27)

PTC = gewundenes Hauptstück DTI = Mittelstück, Markinnenstreifen
DTC = gewundenes Mittelstück

Trotz der hohen Empfindlichkeit der verwendeten Methode konnten die Fehlerquellen weitgehend ausgeschaltet werden.

Die abgelesenen Fluorimeterwerte der Gewebsproben lagen sämtlich im linearen Bereich der mitgeführten Phosphatstandard-Verdünnungsreihe

In der ATPase-Reaktion (s. Abb. 7) wurden während 1o minütiger Inkubation je nach Gewicht und Struktur pro Gewebsprobe 3-7% des im Überschuß zugegebenen ATP gespalten. Somit sank die ATP-Konzentration von 2,28 mM im Reaktionsgemisch (bei Pipettenvolumina von 393 nl und 226 nl) auf Werte um 2,15 mM ab, blieb also während der gesamten Inkubationsdauer im Substrat-Optimum von ca. 2 mM (35).

Für die Phosphatbestimmung ergaben sich mehrere Fehlerquellen. Einmal konnte das eingesetzte ATP-Präparat schon freies Phosphat enthalten. Tatsächlich betrug der Anteil des ATP am Gesamtleerwert ca. 9%. Daraus ließ sich ein Phosphatanteil von o,7% im verwendeten Präparat der Firma Boehringer errechnen. Da jedoch ATP zu Leerwert und Standards gleichermaßen wie zu den Gewebsproben pipettiert wurde, erfolgte die Ausschaltung des durch den 'ATP-Leerwert' verursachten Fehlers automatisch bei der Berechnung des Δ-Fluoreszenzwertes durch Subtraktion des Leerwertes vom Testwert (s. Formel S. 13).

Eine weitere unerwünschte Phosphatquelle stellte das im Gewebe von vornherein vorliegende freie anorganische Phosphat dar. Im proximalen Tubulus maßen wir ein Gewebsphosphat von o,o7 M/kg Trockengewicht; d. h. bei einem Total-ATPase-Wert von 6 MKH im PTC bestanden 7% des nach 1o minütiger Inkubation vorliegenden Phosphats aus Gewebsphosphat, das nicht durch ATP-Spaltung entstanden war. Bei einem distalen Tubulus (DTI, DTC) mit einer Enzymaktivität von 12 MKH Total-ATPase betrug dieser Anteil 2% (Gewebsphosphat o,o4 M/kg Trockengewicht). Da dieser'Gewebeleerwert' im Gegensatz

zum 'ATP-Leerwert' nicht im mitgeführten Gesamtleerwert enthalten war, liegen die in der Tabelle aufgeführten Aktivitätswerte der Total-ATPase um einen kleinen absoluten Betrag zu hoch. Da derselbe Betrag jedoch auch in den Werten der Mg-ATPase enthalten war, wurde der Fehler bei der Differenzbildung zur Errechnung der NaKATPase, der allein durch ihre Ouabain-Empfindlichkeit von der übrigen ATPase-Aktivität unterschiedenen Fraktion, wiederum automatisch beseitigt. Aus demselben Grund konnten auch etwaige Aktivitäten von freigewordenen lysosomalen Enzymen die NaKATPase-Aktivitätswerte nicht verfälschen.

D I S K U S S I O N

Die Tatsache, daß die NaKATPase durch Aldosteron beeinflußt wird, ist nicht verwunderlich, wenn man eine Identität zwischen Enzym und Pumpe annimmt (s. S. 1/2). Die an der Mikrosomenfraktion ausgeführten Untersuchungen zeigten jedoch nach Adrenalektomie bzw. darauffolgender Aldosterongabe jeweils eine der Na-Transportänderung stark nachhinkende Veränderung der NaKATPase-Aktivität (s. S. 2), ein Befund, der keine direkte Beziehung zwischen NaKATPase und Transportmechanismus vermuten läßt (3, 2o, 25). Die verspätete Reaktion der Enzymaktivität wurde vielmehr als sekundärer Effekt auf den erhöhten Na-Transport bei chronischer Aldosteronverabreichung hin gedeutet.

Aktivitätsmessungen am isolierten Tubulus zeigen jedoch, daß die NaKATPase auf adäquate Beeinflussung rasch mit einer Aktivitätsänderung reagieren kann. So ergaben quantitativ histochemische Untersuchungen an der Rattenniere nach Adrenalektomie eine gute zeitliche Korrelation zwischen Verminderung des Na-Transportes und Abfall der Enzymaktivität (36). Eine übereinstimmende Reaktion beider Systeme wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Aus den gewonnenen Ergebnissen geht hervor, daß das Mineralokortikoid Aldosteron in der Lage war, 9o Minuten nach intraperitonealer Injektion den nach Adrenalektomie auftretenden Abfall der NaKATPase-Aktivität im proximalen und distalen Tubulus aufzuheben.

Diese Ergebnisse erlangen durch die Besonderheiten der angewandten Methodik gewichtigere Bedeutung. Die Quantitative Histochemie bietet den Vorteil der Analyse am präparatorisch völlig unveränderten, lyophilisierten Gewebe. Ferner kann jede beliebige Struktur gezielt isoliert und gesondert untersucht werden. An der Niere, einem Organ mit heterologer morphologischer Architektonik, kann die Lowry-Technik also

Aufschluß über die verschiedenen biochemischen Vorgänge geben, die den einzelnen anatomischen Strukturen zugeordnet sind. Mit Hilfe des enzymatischen Cycling und der Verkleinerung der Lösungsvolumina bei der Öltröpfchen-Technik bedarf es für die Analyse nur noch Gewebsmengen von wenigen Nanogramm, wie zum Beispiel eines einzelnen Tubulus. Die Möglichkeit der Verfälschung durch ein 'Pooling', d. h. die Analyse mehrerer Tubuli zugleich, ist damit ausgeschlossen.

Demgegenüber liegt in der Mikrosomenfraktion ein Gemisch von Membranen aus allen Strukturen des Nierengewebes vor. Der Aktivitätswert eines Enzyms aus der Mikrosomenfraktion stellt eine summarische Größe dar, die keiner Struktur zuzuordnen ist. Überdies sind im Rattennierenhomogenat die distalen Tubuli als NaKATPase-aktivitätsreiche Nephronabschnitte volumenmäßig gering vertreten, so daß eine frühzeitige Aktivitätsänderung nicht erfaßt wird. Außerdem werden bei der Herstellung der Mikrosomenfraktion Detergentien verwendet, die die Struktur der Membran verändern, indem sie die für die NaKATPase essentiellen Phospholipide teilweise aus dem Membrangefüge herauslösen. Dies kann zu einer Beeinflussung des Transportsystems führen.

Die mit Hilfe der Q. H. gemachten Beobachtungen über Lokalisation und Zeitpunkt der Aldosteronwirkung stimmen mit Befunden aus Mikropunktions- und Urinelektrolytuntersuchungen überein (s. S. 2). Aus unseren Ergebnissen (S. 16) geht hervor, daß es nach Aldosterongabe nicht nur im distalen, sondern auch im proximalen Tubulus zu einem Anstieg der NaKATPase-Aktivität kommt. Dies bestätigt Befunde aus den Mikropunktionsversuchen, wonach der Angriffspunkt des Aldosterons in beiden Tubulusabschnitten zu suchen ist (14, 16, 44). Ebenso stimmt die Beobachtung über den Zeitpunkt der Aldosteronwirkung von 9o Minuten nach Verabreichung mit der Auffassung überein, daß zwischen Applikation des Hormons und Wirkungseintritt eine Latenz von ca. 1 Stunde verstreicht (5, 8, 15, 32, 37, 44).

Die Dauer der Latenzperiode zwischen Hormongabe und Wirkungseintritt läßt Rückschlüsse auf den biochemischen Wirkungsmechanismus des Hormons zu.

Nach Karlson (21) gibt es 2 Hauptwirkungsarten der Hormone:

1) Die Wirkung auf die Zellmembran im Erfolgsorgan. Beispiele hierfür sind das Insulin, das Adiureti das Adrenalin und das Glukagon. Hier tritt die Hormonwirkung ohne Latenz sofort ein.

2) Die enzyminduzierende Wirkung. Hierbei sitzt der spezifische Rezeptor als Gen-blockierender Repressor im Zellkern. Das Hormon wirkt als Induktor im Sinne der Theorie von Jacob und Monod; d. h. durch Kopplung des Hormons an den Repressor wird dieser inaktiv. Das betreffende Operator-Gen wird frei, und am zugehörigen DNA-Strang kann mRNA gebildet werden, was im Anschluß die Steigerung der Synthese von Enzymprotein zur Folge hat. Der gesamte Induktionsprozeß dauert mindestens 1 Stunde. Dadurch wird das Auftreten einer Latenzperiode verständlich.

Der Wirkung der Steroidhormone wird in erster Linie der Mechanismus der Enzyminduktion zugrunde gelegt. Er ist belegt für das Cortisol (11, 22), für das Östradiol (4o) und für das Testosteron (45).

Auch für das Aldosteron bestehen Hinweise dafür, daß eine de-novo-Synthese von Enzymprotein über den Weg einer RNA-Vermehrung stattfindet. Während der charakteristischen Latenzzeit von ca. 6o Minuten wird das Aldosteron zunächst an die spezifischen Hormonrezeptoren im Erfolgsgewebe gebunden. Dieser Prozeß ist nach 15-3o Minuten abgeschlossen (8, 37). Eine Inkubationsdauer des Gewebes mit dem Hormon von 5 Minuten genügt bereits, um nach der Latenz eine Wirkung zu erzielen. Eine langsame Penetration des Gewebes kann also nicht Ursache des verzögerten Wirkungseintritts sein. Autoradiographisch wurden die Hormonrezeptoren im Kern und im perinukleären Raum lokalisiert (8).

Als indirektes Zeichen für eine sich anschließende RNA-Synthese wurde eine vermehrte Inkorporation von Vorstufen beobachtet: an der Krötenblase ^{3}H-Uridin (33, 34), an aus Rattennieren gewonnenen Kernfraktionen ^{3}H-Uridin (2, 4) und ^{3}H-Orotat (12). Der Einbau der Vorstufen geschieht im Kern (33) und wird durch Actinomycin D, einen RNA-Synthesehemmer, blockiert (2, 4, 12). Weiterhin wurde eine Vermehrung der RNA-Polymerase I im Nukleolus, dem wahrscheinlichen Bildungsort der rRNA und tRNA (21), gefunden. Auch im Nukleoplasma, dem Syntheseort der mRNA, wird die Vermehrung einer RNA-Polymerase II wahrscheinlich gemacht (4).

Der direkte Nachweis der RNA-Vermehrung nach Aldosteron ist zur Zeit mangels genügend empfindlicher Methoden noch problematisch. Castles und Williamson stellten nach fraktionierter Zentrifugation von Rattennierenhomogenat unter Aldosteroneinfluß spektrophotometrisch eine Erhöhung der RNA-Konzentration in allen Fraktionen fest (2). Actinomycin D unterdrückte diesen Effekt. Andere Autoren fanden mit der Gel-Elektrophorese (41) oder der Dichtegrad-Zentrifugation (34) keine oder nur unsignifikante Veränderungen im RNA-Muster.

Ebenso widersprüchlich sind Befunde über den Einbau markierter Aminosäuren bei der Proteinsynthese am Ribosom. Fimognari et al. fanden eine erhöhte ^{3}H-Leucin-Inkorporation in der Mikrosomenfraktion des Rattennierenhomogenats. Auch negative Ergebnisse liegen vor (34, 37).

Dagegen bestehen zahlreiche Beobachtungen über die Aufhebung der Aldosteronwirkung durch RNA- und Proteinsynthesehemmer wie Actinomycin D, Cordycepin, Puromycin, Cycloheximid und Aminosäuren-Analoga. Solche Beobachtungen wurden an der Krötenblase (5, 8, 1o, 33, 37), an der Rattenniere (2, 43, 46) und an der Hundeniere (26) gemacht. Dabei wurde festgestellt, daß der K^+- und H^+-ausscheidende Effekt durch Actinomycin D nicht unterdrückt wird (26, 46) und gefolgert, daß diese Wirkung des Hormons, obwohl ebenfalls erst nach Latenz auftretend, von einer Proteinsynthese unabhängig ist. Weiterhin wurde festgestellt, daß es einen von Aldosteron unabhängigen basalen Na-Transport gibt, der nur durch hohe Dosen Actinomycin D oder Puromycin vermindert wird (1o, 26, 37, 43).

Nimmt man für den Wirkungsmechanismus des Aldosterons eine Synthese von Enzymprotein an, so müßten bestimmte Enzyme erhöhte Aktivitäten aufweisen. Tatsächlich wurde am Rattennierenhomogenat nach Adrenalektomie die Aktivität von Enzymen des Citratzyklus wie Citratsynthase, NADP-Isocitratdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und der Glykolyse wie GAPDH, weiterhin von GLDH und GOT erniedrigt gefunden. Dieser Aktivitätsabfall wurde durch Aldosteron zum größten Teil rückgängig gemacht(24,27). Danach würde das Aldosteron die Synthese von Enzymen induzieren, die in energieliefernde Stoffwechselprozesse wie Glykolyse und Citratzyklus eingeschaltet sind, bzw. das Aldosteron würde die für den Na-Transport notwendige Gewinnung von ATP aus den Substraten Glukose und Pyruvat beschleunigen,

indem es die Aktivitäten der die dazwischengeschalteten Stoffwechselreaktionen katalysierenden Enzyme erhöht. Läßt man Aldosteron auf die substratverarmte Krötenblase einwirken, so zeigt sich nach der Latenz keine Erhöhung des Na-Transports. Ebensowenig wirkt Aldosteron unter anaeroben Bedingungen (37). Pyruvat- bzw. Sauerstoffzufuhr haben dann ein augenblickliches Ansteigen der Na-Transportrate zur Folge.

Schmidt und Dubach fanden an isolierten Abschnitten des proximalen und distalen Nierentubulus der adrenalektomierten Ratte die Aktivität eines weiteren Enzyms, der NaKATPase, erniedrigt (36). Der direkte Einfluß des Hormons auf das Transportenzym konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die beobachtete prompte Erniedrigung bzw. Erhöhung der Enzymaktivität könnte allein schon durch Veränderung des Substratangebotes erfolgen (Michaelis-Menten-Kinetik), in diesem Falle also durch verändertes ATP-Angebot, das ebenfalls durch Aldosteron geregelt wird. Dem steht entgegen, daß bei der enzymatischen Analyse die Enzymaktivität unter optimierten Bedingungen bestimmt wird. Die Aktivitätserhöhung unter Aldosteron muß also durch eine Erhöhung der katalytisch wirkenden Potenz zustande kommen. Eine hormoninduzierte de-novo-Synthese der NaKATPase wäre dabei durchaus denkbar. Demnach würde das Aldosteron auf bioenergetisch sinnvollstem Wege auf den Na-Transport wirken, indem es (a) die Pumpe in Form der NaKATPase stimuliert und (b) die Bereitstellung der dazu notwendigen Energie in Form von ATP über Glykolyse und Citratzyklus fördert.

Obwohl die Argumente für eine enzyminduzierende Wirkung des Aldosterons überwiegen, gibt es Anhaltspunkte dafür, daß das Hormon in der Lage ist, die Zellmembran zu beeinflussen. Diese Eigenschaft besitzen offensichtlich alle Steroidhormone. Bangham et al. untersuchten an künstlich aus Phospholipiden geschaffenen Membransystemen (Sphäruliten) deren Durchlässigkeit für Kationen (1). Dabei wirkten Glukokortikoide membranabdichtend, während Mineralokortikoide

die Durchlässigkeit erhöhten. Ähnliches gilt für die Permeabilität für Glukose (42). Die Funktion der NaKATPase ist an die Unversehrtheit der Membran gebunden und kann durch Lipidextraktion, unter der Einwirkung von Detergentien (z. B. Desoxycholsäure) oder durch Phospholipase C eingeschränkt werden (9). Adrenalektomie führt bei der Ratte an der Fraktion der Mitochondrien und Mikrosomen zu einem Abfall des Phospholipidgehaltes, der durch Aldosteron rückgängig gemacht werden kann (18).

Gegen einen - eher unspezifischen - Membraneffekt des Aldosterons spricht jedoch, daß nach Adrenalektomie andere membrangebundene Enzyme wie die MgATPase oder die Adenylcyclase und die 5'-Nukleotidase keine Aktivitätsminderung zeigen (13, 36).

Der Wirkungsmechanismus des Aldosterons ist also noch nicht vollständig geklärt. Immerhin konnte in dieser Arbeit der direkte Zusammenhang zwischen dem Mineralokortikoid und der NaKATPase als Repräsentant der Na-Pumpe gezeigt werden. Es stellte sich heraus, daß das Transportenzym die Fähigkeit besitzt, seine Aktivität einem adäquaten Stimulus akut zu adaptieren. Dieser Nachweis gelang mit der Quantitativen Histochemie, einer Methode, die unter größtmöglicher Schonung des Gewebes die Messung der Enzymaktivität am gezielt isolierten Wirkungsort erlaubte.

Z U S A M M E N F A S S U N G

An einzelnen Nephronabschnitten von 12 ca. 2oo g schweren adrenalektomierten männlichen Wistar-Ratten wurde mit den Methoden der Quantitativen Histochemie (Lowry-Technik) die Wirkung von Aldosteron auf die NaKATPase (EC 3.6.1.3), ein mit dem Na-Transport eng gekoppeltes Enzym, untersucht. Durch mehrere methodische Besonderheiten konnte die Empfindlichkeit der Enzymanalyse erheblich gesteigert werden: Erhöhung der Substratkonzentrationen durch Verkleinerung der Reaktionsvolumina auf wenige Nanoliter mit Hilfe der Öltröpfchentechnik (S. 9) und enzymatische Bestimmung des bei der NaKATPase-Reaktion abgespaltenen anorganischen Phosphates (S. 14) mit angeschlossener Vervielfachung des Reaktionsproduktes in einer enzymatischen Verstärkerreaktion, dem $NADPH_2$-Cycling (S. 9).

Bei den adrenalektomierten Tieren war die Aktivität der NaKATPase im proximalen (PTC) und distalen Konvolut (DTC) sowie im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (DTI) um mehr als 85% des Normalwertes vermindert. Durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von 6o µg Aldosteron pro kg Ratte kam es 9o Minuten später in allen drei Strukture zu einem Anstieg der Enzymaktivität. Im PTC und DTI waren die Werte auf 4o-5o %, im DTC auf ca. 1oo% des Normalwertes erhöh Damit wurde gezeigt, daß die NaKATPase nach adäquater Stimulation rasch mit einer Aktivitätsänderung reagieren kann. Die Enzymaktivität korreliert zeitlich gut mit der Tätigkeit der Na-Pumpe. Die Auffassung von einer engen Verknüpfung oder gar einer Identität zwischen NaKATPase und transmembranem Na-Transport kann bestätigt werden.

Der Wirkungsmechanismus des Aldosterons verläuft wahrschei lich über eine Enzyminduktion. Davon sind Enzyme der Glykolys und des Citratzyklus betroffen, so daß durch Aldosteron mehr Energie für den aktiven Na-Transport bereitgestellt wird. Darüber hinaus kommt es aber offensichtlich auch zu einer Sti mulation der Pumpe selbst in Form einer de-novo-Synthese der NaKATPase.

Z A H L E N T A B E L L E N

1) Am PTC gewonnene Werte

	Adrenalektomie		
	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	4,583	4,564	o,o19
	4,781	4,328	o,453
	5,o14	4,965	o,o49
	5,427	5,378	o,o49
	4,913	4,884	o,o29
	4,913	6,476	-1,563
	4,2o7	5,172	-o,965
	4,2o3	4,o72	o,131
	4,537	4,291	o,246
	7,633	7,6o5	o,o28
	3,643	3,923	-o,28o
$\bar{x}$	4,896	5,o6o	-o,164
SDM	1,o27	1,1o8	o,587
SEM	o,31o	o,334	o,177

	Adrenalektomie + Aldosteron		
	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	6,64o	6,113	o,527
	6,496	5,735	o,761
	6,164	5,624	o,54o
	5,375	5,356	o,o19
	4,735	4,421	o,314
	4,965	4,773	o,192
	4,211	4,259	-o,o38
	5,626	5,259	o,367
	7,oo1	5,319	1,682
	6,3o7	4,349	1,958
	4,955	4,249	o,7o6
	6,24o	4,953	1,287
$\bar{x}$	5,726	5,o34	o,693
SDM	o,875	o,631	o,638
SEM	o,253	o,182	o,184
Signifikanz	$p < o,o5o$	$p < o,95$	$p < o,oo5$

2) Am DTI gewonnene Werte

	Adrenalektomie		
	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	4,664	4,492	o,172
	4,565	4,268	o,297
	7,816	6,9o7	o,9o9
	7,617	4,973	2,644
	8,579	4,965	3,614
	6,973	5,o74	1,899
	6,2o6	5,834	o,372
	5,585	5,54o	o,o45
	9,692	5,495	4,197
	8,778	6,167	2,611
	7,663	6,o48	1,615
	6,657	6,131	o,526
$\bar{x}$	7,o66	5,491	1,575
SDM	1,6o9	o,769	1,423
SEM	o,464	o,222	o,411

	Adrenalektomie + Aldosteron		
	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	9,751	5,591	4,16o
	9,863	5,92o	3,943
	14,44o	8,958	5,482
	7,261	6,516	o,745
	1o,857	5,567	5,29o
	1o,459	5,285	5,174
	15,711	5,971	9,74o
	12,697	7,2o1	5,496
	12,996	6,131	6,865
	19,o48	6,o84	12,964
	18,719	5,51o	13,2o9
	1o,729	6,6o7	4,122
	7,291	5,491	1,8oo
$\bar{x}$	12,294	6,218	6,o76
SDM	3,813	o,983	3,8oo
SEM	1,o57	o,273	1,o54
Signifikanz	$p < o,oo1$	$p < o,1oo$	$p < o,oo1$

3) Am DTC gewonnene Werte

Adrenalektomie

	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	1o,921	8,7o3	2,218
	6,66o	6,6o7	o,o53
	11,o64	1o,389	o,725
	7,81o	7,468	o,342
	8,645	7,368	1,277
	11,171	1o,o29	1,142
	9,332	8,222	1,11o
	8,696	8,1o2	o,594
	12,411	9,377	3,o34
	6,437	8,358	-1,921
	7,663	7,334	o,329
	8,121	7,334	o,787
	9,642	8,298	1,344
$\bar{x}$	9,121	8,272	o,849
SDM	1,845	1,111	1,16o
SEM	o,512	o,3o8	o,322

Adrenalektomie + Aldosteron

	Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
Aktivität (MKH)	16,575	6,9o6	9,669
	16,13o	7,696	8,434
	15,153	8,696	6,457
	12,9o8	8,772	4,136
	17,268	4,672	12,596
	9,643	4,o19	5,624
	8,275	5,159	3,116
	13,o6o	5,695	7,365
	2o,499	7,291	13,2o8
	13,794	4,491	9,3o3
	12,3o3	7,432	4,871
	16,797	5,816	1o,981
$\bar{x}$	14,367	6,387	7,98o
SDM	3,416	1,634	3,284
SEM	o,986	o,472	o,949
Signifikanz	$p < o,oo1$	$p < o,oo5$	$p < o,oo1$

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Bangham, A.D., M.M. Standish and G. Weissman: The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations

J. molec. Biol. 13, 253-259 (1965)

2. Castles, T.R. and H.E. Williamson: Stimulation in vivo of renal RNA-synthesis by aldosterone

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 119, 3o8-311 (1965)

3. Chignell, C.F. and E. Titus: Effect of adrenal steroids on a Na^+- and K^+-requiring adenosine triphosphatase from rat kidney

J. Biol. Chem. 241, 5o83-5o89 (1966)

4. Chu, L.L.H. and I.S. Edelman: Cordycepin and -Amanitin: inhibitors of transcription as probes of aldosterone action

J. Membrane Biol. 1o, 291-31o (1972)

5. Crabbé, J. and P. de Weer: Action of aldosterone on the bladder and skin of toad

Nature 2o2, 298-299 (1964)

6. Dubach, U.C.: Quantitative Histochemie der Niere. Untersuchungen mit Hilfe der Lowry-Methoden am Nephron

Klin. Wschr. 41, 157-162 (1963)

7. Ebel, H., N.G. de Santo und K. Hierholzer: Besteht eine Korrelation zwischen Membran-ATPase und steroidabhängiger Na-Resorption in der Rattenniere?

Pflügers Arch. ges. Physiol. 3oo, R28-R29 (1968)

8. Edelman, I.S., R. Bogoroch and G.A. Porter: On the mechanism of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 5o, 1169-1176 (1963)

9. Emmelot, P. and C.J. Bos: Studies on plasma membranes. V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolated rat-liver plasma membranes

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 15o, 341-353 (1968)

1o. Fanestil, D.D. and I.S. Edelman: On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: effects of inhibitors of RNA and of protein synthesis

Federation Proc. 25, 912-916 (1966)

11. Feigelson, P. and M. Feigelson: Studies on the mechanism of regulation by cortisone of the metabolism of liver pruine and ribonucleic acid

J. biol. Chem. 238, 1o73-1o77 (1963)

12. Fimognari, G.M., D.D. Fanestil and I.S. Edelman: Induction of RNA and protein synthesis in the action of aldosterone in the rat

Am. J. Physiol. 213, 954-962 (1967)

13. Hendler, E.D., J. Toretti, L. Kupor and F.H. Epstein: Effects of adrenalectomy and hormone replacement on Na-K-ATPase in renal tissue

Am. J. Physiol. 222, 754-76o (1972)

14. Hierholzer, K. and H. Stolte: The proximal and distal tubular action of adrenal steroids on Na reabsorption

Nephron 6, 188-2o4 (1969)

15. Hierholzer, K., M. Wiederholt, H. Holzgreve, G. Giebisch, R.M. Klose and E.E. Windhager: Micropuncture study of renal transtubular concentration gradients of sodium and potassium in adrenalectomized rats

Pflügers Arch. ges. Physiol. 285, 193-21o (1965)

16. Hierholzer, K., M. Wiederholt und H. Stolte: Hemmung der Natriumresorption im proximalen und distalen Konvolut adrenalektomierter Ratten

Pflügers Arch. ges. Physiol. 291, 43-62 (1966)

17. Hoffman, J.F.: Cation transport and structure of the red-cell plasma membrane

Circulation XXVI, 12o1-1213 (1962)

18. Johnson, J.D. and W.E. Cornatzer: Phospholipid compositio of mitochondria and microsomes of liver and kidney in adrenalectomized, hypophysectomized, and diabetic

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 131, 474-478 (1969)

19. Jørgensen, P.L.: Regulation of the (Na^++ K^+)-activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney. I. The effect of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 151, 212-224 (1968)

2o. - : Regulation of the (Na^++ K^+)-activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney. II. The effect of aldosterone on the activity in kidneys of adrenalectomized rats

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 192, 326-334 (1969)

21. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 8. Aufl., Stuttgart, Thieme Verlag, 1972

22. Karlson, P. and C.E. Sekeris: Biochemical mechanism of hormone action

Acta endocrin. 53, 505-518 (1966)

23. Katz, A. and F.H. Epstein: The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney

J. clin. Invest. 46, 1999-2011 (1967)

24. Kinne, R. und R. Kirsten: Der Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme in der Rattenniere

Pflügers Arch. ges. Physiol. 300, 244-254 (1968)

25. Landon, E.J., N. Jazab and L. Forte: Aldosterone and sodium-potassium-dependent ATPase activity of rat kidney membranes

Am. J. Physiol. 211, 1050-1056 (1966)

26. Lifschitz, M.D., R.W. Schrier and I.S. Edelman: Effect of actinomycin D on aldosterone-mediated changes in electrolyte excretion

Am. J. Physiol. 224, 376-380 (1973)

27. Losert, W., G. Schultz, R. Sitt, K. von Bergmann, M. Hoffmann, P. Marx, A. Zesch und H.K. Bartelheimer: Neuere Befunde zum Wirkungsmechanismus von Aldosteron und Diuretica

Arzneimittelforsch. 19, 709-719 (1969)

28. Lowry, O.H.: The quantitative histochemistry of the brain

J. Histochem. Cytochem. 1, 420-428 (1953)

29. Lowry, O.H.: The chemical study of single neurons

Harvey Lect. 58, 1-19 (1963)

3o. Lowry, O.H., J.V. Passoneau, D.W. Schulz and M.K.Rock: The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling

J. biol. Chem. 236, 2746-2755 (1961)

31. Lowry, O.H. and J.V. Passoneau: Some recent refinements of Quantitative Histochemical analysis

In: Dubach, U.C. and U. Schmidt: Recent advances in Quantitative Histo-and Cytochemistry
In: Current problems in clinical biochemistry 3, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna, 1971

32. Marx, P.: Renale Wirkungen des Aldosterons und seines Antagonisten Spironolacton

Inaug.-Diss. Med. Fak. Freie Univ. Berlin (1966)

33. Porter, G.A., R. Bogoroch and I.S. Edelman: On the mechanism of action of aldosterone on sodium transpor the role of RNA-synthesis

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 52, 1326-1333 (1964)

34. Rousseau, G. and J. Crabbé: Effects of aldosterone on RNA and protein synthesis in the toad bladder

Eur. J. Biochem. 25, 55o-559 (1972)

35. Schmidt, U. und U.C. Dubach: Quantitative Histochemie am Nephron

In: Progr. Histochem. Cytochem. 2, 185-298 (1971) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Portland-Oregon-USA, 1971

36. Schmidt, U. and U.C. Dubach: Sensitivity of Na^+K^+ adenosine triphosphatase activity in various structures of the rat nephron: studies with adrenalectomy

Europ. J. clin. Invest. 1, 3o7-312 (1971)

37. Sharp, G.W.G. and A. Leaf: Mechanism of action of aldosterone

Physiol. Rev. 46, 593-633 (1966)

38. Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane

Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965)

39. Stolte, H., J.P. Brecht, M. Wiederholt und K. Hierholzer: Einfluß von Adrenalektomie und Glukokortikoiden auf die Wasserpermeabilität corticaler Nephronabschnitte der Rattenniere

Pflügers Arch. ges. Physiol. 299, 99-127 (1968)

4o. Ui, H. and G.C. Mueller: The role of RNA synthesis in early estrogen action

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 5o, 256-26o (1963)

41. Vancura, P., G.W.G. Sharp and R.A. Malt: Kinetics of RNA synthesis in toad bladder epithelium: action of aldosterone during the latent period

J. clin. Invest. 5o, 543-551 (1971)

42. Weissmann: Effect of steroids and 'triton X-1oo' on glucose-filled phospholipid/cholesterol structures

Nature 2o8, 649-651 (1965)

43. Wiederholt,M.: Mikropunktionsuntersuchungen am proximalen und distalen Konvolut der Rattenniere über den Einfluß von Actinomycin D auf den mineralcorticoidabhängigen Na-Transport

Pflügers Arch. ges. Phys. 292, 334-342 (1966)

44. Wiederholt, M., H. Stolte, J.P. Brecht und K. Hierholzer: Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenalektomierter Ratten

Pflügers Arch. ges. Physiol. 292, 316-333 (1966)

45. Williams-Ashman, H.G., S. Liao, R.L. Hancock, L. Jurkowitz and D.A. Silverman: Testicular hormones and the synthesis of ribonucleic acids and proteins in the prostate gland

Recent Progr. Hormone Res. 8o, 247-3o1 (1964)

46. Williamson, H.E.: Mechanism of antinatriuretic action of aldosterone

Biochem. Pharmacol. 12, 1449-145o (1963)

N A C H W O R T

Herrn Universitätsdozent Dr. med. U. Schmidt danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die angenehmen Arbeitsbedingungen und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 3. 8. 1947 wurde ich, Harald Schmid, als drittes Kind des Zahnarztes Dr. Karl Schmid und seiner Ehefrau Marga Schmid geb. Ohmstede in Esslingen geboren. Von 1954 bis 1958 besuchte ich in Nürtingen die Grundschule und weitere neun Jahre das dortige Max-Planck-Gymnasium, an dem ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Medizinstudium an der Universität Heidelberg, wo ich 1967 die naturwissenschaftliche, 1969 die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach dem ersten klinischen Semester studierte ich drei Semester an der Universität Hamburg und zwei Semester an der Universität Tübingen, wo ich am 4. 8. 1972 mein medizinisches Staatsexamen bestand.